

ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСНОГО ФИТОИЗВЛЕЧЕНИЯ И РАЗРАБОТКА МИКРОКАПСУЛ НА ЕГО ОСНОВЕ

В. Э. Ким, Э. Ф. Степанова

*Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал
ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, г. Пятигорск*

Поступила в редакцию 01.06.2015 г.

Аннотация. В статье представлены экспериментальные данные по выбору оптимального состава комплексного фитоизвлечения на основе корней шлемника байкальского, травы пустырника и корневищ с корнями синюхи голубой с использованием биологического теста на *Paramecium Caudatum*. Представлены данные по выбору оптимального способа получения микрокапсул с фитоизвлечением и его общая схема. Фармакологический эффект микрокапсул седативный.

Ключевые слова: парамеции, микрокапсулы, фитоизвлечение, биофармация

Abstract. Experimental data are presented in article at the choice of optimum structure of complex phytoextraction on the basis of a grass of a Motherwort, roots of a Baikal skullcap, rhizomes with roots of a Jacob's ladder with use of biological test for *Paramecium Caudatum*. Data on a choice of an optimum way of receiving microcapsules with phytoextraction and its general scheme are submitted. Pharmacological effect of microcapsules the sedative.

Keywords: parametion, microcapsules, phytoextraction, biopharmacy

Биотестирование – оценка реакции тест-организмов на ту или иную субстанцию. В качестве таковых для оценки токсичности использовали парамеции. Профессор А.Н. Кудрин провел исследования по сравнительной оценке токсичности спиртовых растворов, лекарственных чаёв [1]. В фармакологии парамеции как биологическую модель используют для скрининга лекарственных средств антиоксидантного и мембран-стабилизирующего типов действия.

В настоящее время разработка инновационных лекарственных форм, особенно с возможностью пролонгирования терапевтического эффекта, является актуальной задачей фармацевтической науки и практики. К таким можно отнести микрокапсулы с их помощью можно уменьшить реакционную способность, удлинить сроки годности неустойчивых и быстро портящихся веществ, снизить токсичность субстанций, придать продукции новые физические свойства, а именно, снизить летучесть, изменить плотность, замаскировать цвет, вкус, запах [2].

Нами были разработаны микрокапсулы седативного действия на основе комплексного фитоизвлечения из лекарственного растительного сырья. А именно, корней шлемника байкальского, травы пустырника и корневищ с корнями синюхи голубой (исследовались пять составов из выше перечисленных ЛР в различной количественной комбинации). Данная лекарственная форма показала выраженный седативный эффект, сравнимый с препаратом - таблетки сухого экстракта пустырника.

Целью настоящей работы является проведение экспресс-анализа биологической активности комплексного фитоизвлечения и разработка микрокапсул на его основе

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

На первом этапе настоящего исследования был проведен эксперимент по определению биологической активности и токсичности веществ на парамециях - культуре *Paramecium caudatum*, выделенных из естественных мест обитания, из которой для дальнейшего исследования были получены отдельные клоны (от одной особи бесполом

путем). Массовые культуры парамеций постоянно находились в среде Л.К. Лозина-Лозинского [1]. Пищей для парамеций служили живые дрожжи - *Rhodotorula gracilis* с добавлением пшеничной муки.

Оборудование: бинокулярный микроскоп Биолам, предметные стекла, пипетки автоматические градуированные с наконечником, рН-метр.

Подготовка биологического материала к проведению эксперимента (определение чувствительности парамеций) проводилась следующим образом: на предметное стекло наносили две капли среды, содержащей парамеции (число особей в каждой капле не менее 5), одна капля служила контролем, ко второй тангенциально (сбоку) прибавляли каплю соответствующего объема 0.9% раствора хлорида натрия. При добавлении раствора натрия хлорида наблюдалось заметное ускорение движения по сравнению с контролем. Этот опыт повторяли 5 раз. При этом парамеции считаются чувствительными в случае ускорения движения не более 4 особей из 5 по результатам 5 измерений. Для оценки чувствительности парамеций по параметру - замедление движений - использовали 0.5% раствор калия хлорида и проводили опыты по аналогичной методике. При этом парамеции считаются чувствительными в случае замедления движения не менее 4 особей из 5 по сравнению с контролем. Культура парамеций считается чувствительной по положительным результатам проб с 0.9% раствором натрия хлорида и 0.5% раствором калия хлорида.

Проведение испытаний на биологическую активность и токсичность. На предметное стекло наносили три капли среды, содержащей парамеции (должно быть не менее 5 особей в капле). Одна капля служит контролем, ко второй капле прибавляли каплю раствора исследуемого вещества в наибольшем разведении (например, 1×10^{-6} г/мл), к третьей с меньшим разбавлением (например, 1×10^{-5} г/мл). Наблюдали 5-7 мин за изменением движения парамеций, отмечали характерные изменения в их движении: ускорение, замедление, круговые хаотичные движения. С целью выяснения развития эффекта во время наблюдения можно увеличить до 30 мин время от момента добавления исследуемой концентрации вещества. Затем на новом предметном стекле устанавливали концентрацию вещества, которая вызывает изменение формы парамеций или лизис. С каждой концентрацией опыты повторяют не менее 5 раз.

Информативными являются следующие показатели: наименьшая концентрация, вызывающая ускорение или замедление движения – пороговая концентрация; концентрация, вызывающая необратимую остановку – остановочная концентрация, и приводящая к лизису – лизирующая. О степени биологической активности судили по величине пороговой концентрации: чем меньше эта величина, тем выше активность.

Изучение протективной активности по отношению к клеточным ядам проводили со спиртом этиловым и водорода пероксидом, которые создают патологическую модель повреждения мембраны клетки. Этиловый спирт повреждает белковую часть биомембраны, пероксид водорода инициирует ПОЛ мембраны [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В процессе наблюдения за культурой клеток фиксировали число особей в одной капле и средних (преобладающий) размер клеток. Для подсчета числа инфузорий использовали гемоцитометрический способ (камера Горяева). Различия в концентрации живых парамеций в опытной и контрольной пробах, а также в их размере являлось критерием токсичности или экологически благоприятной среды для одноклеточного организма.

Анализ результатов хронического опыта свидетельствует, что все пять экспериментальных композиций являются экологически благоприятными для выбранной биологической модели. Клетки парамеций в опытных группах (культуральная среда: очищенная вода с добавлением испытуемой комбинации) по размеру и форме не отличались от клеток контрольной группы (культуральная среда: очищенная вода). Вместе с тем скорость размножения парамеций во всех опытных группах, особенно в четвертой, более чем в 2 раза превышала данный показатель в контроле. Кроме того, инфузории в среде, содержащей четвертую фитокомпозицию, отличались значительно более высокой подвижностью, чем в контроле (табл. 1). Установлено, что все пять фитокомпозиций существенно удлиняли период сохранения двигательной активности инфузорий от момента добавления токсиканта до их остановки (табл. 2).

Таким образом, результаты хронического и острого опытов показали, что наиболее благоприятной для используемой биологической модели оказалась композиция № 4. Под ее воздействием

заметно повышались двигательная активность и частота деления клеток парameций, в результате чего к третьим суткам их количество превосходило контроль в 5 раз. Кроме того, композиция № 4 оказывала максимальные мембраностабилизирующий и антиоксидантный эффекты, что проявлялось статистически значимым удлинением времени остановки движения парameций под воздействием спирта этилового (в 2 раза) и перекиси водорода (в 3 раза).

Следующим этапом экспериментального исследования, а именно, получение микрокапсул на основе оптимальной фитокомпозиции было определение метода получения микрокапсул.

Рядом авторов отмечено преимущество метода диспергирования по сравнению с методом простой коацервации: а именно его простота и обеспечение большей полноты микрокапсулирования [2, 4].

Для подтверждения преимуществ этого метода по сравнению с методом простой коацервации сравнивали технологический выход микрокапсулированного комплексного извлечения, полученного двумя методами.

Сравнительный анализ данных параметров микрокапсулирования показал, что микрокапсулирование методом диспергирования проходит полнее, о чем свидетельствуют достаточно высокий технологический выход (90%), общая продолжительность технологического процесса составляющая 8 часов, по сравнению с методом простой коацервации (24 часа).

Для получения микрокапсул методом диспергирования в несмешивающихся жидкостях необходимо наличие двух фаз – гидрофильной и гидрофобной. В качестве дисперсионной среды, т.е. диспергируемой жидкости изучены: масло подсолнечное, глицерин, вазелиновое масло. Оптимальным из которых оказалось масло подсолнечное.

На рисунке 1 представлена общая схема получения микрокапсул с комплексным фитоизвлечением методом диспергирования.



Рис. 1. Общая схема получения микрокапсул с комплексным фитоизвлечением методом диспергирования.

В результате проведенных исследований был установлен основной фармакологический эффект полученных микрокапсул – седативный.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты хронического и острого опытов позволили выбрать наиболее оптимальную фитокомпозицию на основе которой были в последующем разработаны микрокапсулы.

Перспективным методом получения микрокапсул оказался метод диспергирования, так как технологический выход (90%), общая продолжительность технологического процесса - 8 часов, что существенно ниже времени при простой коацервации.

Таблица 1.

Экспресс-оценка биологической активности экспериментальных фитокомпозиций в хроническом опыте.

Объект исследования	Размер парameций, мкм	Экспозиция, часы			
		24	48	72	120
Композиция № 1	158 ± 10	-	-	-	±
Композиция № 2	152 ± 8	-	БА	БА	±
Композиция № 3	157 ± 8	-	-	БА	-
Композиция № 4	161 ± 15	-	-	-	-
Композиция № 5	156 ± 10	-	БА	-	-
Контроль	155 ± 10	-	-	-	-

В таблице приведены средние значения из 6 определений.

Примечание, (-) – отсутствие биологической активности, инфузории совершают хаотичные броуновские движения; БА – движения инфузორий изменены; (±) – погибло около 50% инфузорий.

Таблица 2.

Влияние экспериментальных фитокомпозиций на продолжительность сохранения двигательной активности парameций после добавления клеточных ядов (острый опыт).

Объект исследования	Время остановки парameций в 14%-м этаноле, мин	Время остановки парameций в 1%-м растворе пероксида водорода, мин
Композиция № 1	14.32 ± 0.38	4.42 ± 0.08
Композиция № 2	15.12 ± 0.12	6.20 ± 0.20
Композиция № 3	16.33 ± 0.50	6.83 ± 0.32
Композиция № 4	18.83 ± 0.69	8.05 ± 0.45
Композиция № 5	16.98 ± 0.38	5.57 ± 0.24
Контроль	9.90 ± 0.29	3.42 ± 0.08

В таблице приведены средние значения из 6 определений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кудрин А.Н. Система экспресс – методов интегральной оценки биологической активности индивидуальных и комплексных препаратов на биологических объектах / А.Н. Кудрин, В.В. Ананин, В.Ю. Балабьян // Рос. Хим. журн. — 1997. — Т. 41, № 5. — С. 114-123.

2. Ляпустин, А.В. Перспективы применения методов инкапсулирования в малотоннажной технологии получения биологических препаратов / А.В. Ляпустин // Биотехнология, экология, меди-

цина. Материалы III-IV Международных научных семинаров 2001-2002гг. — 2002. — С. 42-45.

3. Использование экспресс – методов оценки биологической активности на культуре клеток при разработке фитопрепаратов адаптогенного действия / Э.Ф. Степанова [и др.] // Фармация на современном этапе — проблемы и достижения: Науч. тр. — 2000. — Т. 39, Ч. 1. — С. 299-302.

4. D’Onofrio G.P. Encapsulated Microcapsules / G.P. D’Onofrio, R.C. Oppenheim, N.E. Batman // Int. J. Pharm. — 1979. — Vol. 2, № 2. — P. 91-99.

*Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ МЗ РФ
Ким В. Э., аспирант
E-mail: vl_kim@bk.ru
Тел.: +7-918-726-54-34*

*Pyatigorsk Medical-Pharmaceutical Institute – Branch of The Volgograd State Medical University
Kim V. E., post-graduate student
E-mail: vl_kim@bk.ru
Ph.: +7-918-726-54-34*

*Степанова Э. Ф., профессор
E-mail: efstepanova@yandex.ru
Тел.: +7-928-919-83-35*

*Stepanova E. F., professor
E-mail: efstepanova@yandex.ru
Ph.: +7-928-919-83-35*